



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2003 00685**

(22) Data de depozit: **13.08.2003**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.02.2006** BOPI nr. 2/2006

(41) Data publicării cererii:
30.03.2004

BOPI nr. 3/2004

(73) Titular:

• **INSTITUTUL ONCOLOGIC PROFESOR
DR. AL. TREȘTIOREANU,
ȘOSEAUA FUNDENI NR. 252, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, RO**

(72) Inventatori:

• **MANOLESCU NICOLAE,
B-DUL T.VLADIMIRESCU NR. 82, BL. 133,
SC. 1, AP. 1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, RO;**
• **BĂLĂNESCU ION, STR. BULGĂRUȘ
NR. 71, SECTOR 5, BUCUREȘTI, RO;**
• **VALECA ȘERBAN CONSTANTIN,
CALEA CRAIOVEI, BL. 2, SC. A, AP. 9,
PITEȘTI, RO;**
• **TRACU RODIN, STR. MATEI VASILESCU
NR. 53, DROBETA TURNU SEVERIN, RO;**
• **MĂRCULESCU DUMITRU,
COMUNA CERNETI,
JUDEȚUL MEHEDINȚI, RO;**
• **NICULIȚĂ PETRU,
B-DUL IANCU DE HUNEDOARA NR. 4,
AP. 7, SECTOR 3, BUCUREȘTI, RO;**
• **ȘTEFĂNESCU IOAN,
B-DUL NICOLAE BĂLCESCU NR. 4,
RÂMNICU VÂLCEA, RO;**
• **TERBEA IOAN, STR. AL. STĂNILĂ NR. 2,
BL. H12, SC. 4, AP. 7, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, RO;**
• **MORARU VICTORIA,
B-DUL 1 DECEMBRIE 1918 NR. 38, BL. U4,
SC. A, AP. 4, BUCUREȘTI, RO;**
• **COMIȘEL VIRGILIU,
STR. VĂPORAȘII LUI ASSAN NR. 4, SC. 2,
AP. 53, SECTOR 2, BUCUREȘTI, RO;**

• **MATEESCU CORNELIU,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 64, BL. 34,
SC. C, AP. 115, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
RO;**
• **ENCUȚ IOAN, ȘOSEAUA COLENTINA
NR. 26, BL. 64, SC. A, AP. 11, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, RO;**
• **PANAIT MARIETA,
STR. ȘAPTE DRUMURI NR. 18, BL. PM40,
SC. A, AP. 16, SECTOR 3, BUCUREȘTI,
RO;**
• **BEGU DANIELA, STR. BĂRBAT VOIEVOD
NR. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, RO;**
• **CINCA SABIN, STR. DOAMNA GHICA
NR. 3, BL. 2, SC. 2, AP. 50, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, RO;**
• **GRUIA MARIA-IULIANA,
B-DUL BASARABIA NR. 244, BL. MY8,
AP. 19, SECTOR 3, BUCUREȘTI, RO;**
• **BALINT EMILIA, STR. MĂRĂȘEȘTI NR. 1,
BL. 17, SC. B, AP. 17,
COMUNA MĂGURELE, JUDEȚUL ILFOV,
RO;**
• **POP ANETA,
STR. LOCOTENENT GH. SAIDIC, BL. 24,
AP. 54, SECTOR 6, BUCUREȘTI, RO**

(74) Mandatar:

**INVENTA - AGENȚIE UNIVERSITARĂ DE
INVENTICĂ S.R.L.,
B-DUL CORNELIU COPOSU NR. 7, BL. 104,
SC. 2, AP. 31, SECTOR 3, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 5788953; WO 96/03996

(54) **METODĂ PENTRU STABILIREA IN VIVO LA ANIMALE DE
EXPERIENȚĂ, A CONCENTRAȚIEI EFICIENTE DE APĂ
SĂRĂCITĂ ÎN DEUTERIU PENTRU TRATAMENTUL
CANCERULUI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu pentru tratamentul cancerului, ce constă în aceea că prevede administrarea apei sărăcitate în deuteriu, înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale, și are următoarele etape:

A) administrarea la șobolani, prin dietă, a apei sărăcitate în deuteriu la concentrații de 25, 60 și 100 ppm deuteriu, timp de 60 de zile, comparativ cu loturi martor, cu un conținut de 150 ppm deuteriu din apă de la rețea;

B) stabilirea viabilității celulelor tumorale ce

urmează a fi grefate, cu albastru de tripan;

C) grefarea la șobolani de experiență și la loturile martor, de diferite tipuri de celule tumorale;

D) observarea efectelor administrării continue și de lungă durată a apei sărăcitate în deuteriu;

E) stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcitate în deuteriu, pentru regresia tumorală și vindecarea de cancer.

Revendicări: 2

Examinator: dr. medic veterinar MOROIANU IULIANA



Orice persoană interesată are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a hotărârii de acordare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii acesteia

RO 120505 B1

1 Prezenta invenție se referă la o metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animale de expe-
riență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru tratamentul cancerului,
3 metodă ce poate fi aplicată în oncologia experimentală.

Sunt cunoscute procedee și instalații pentru obținerea apei sărăcite în deuteriu, din
5 apă naturală sau apă provenită din apa grea (RO 112422, FR 2 552 324, PCT WO 96/33129,
RU 2182562).

7 De asemenea, sunt cunoscute proprietățile apei sărăcite în deuteriu, în ceea ce pri-
vește ameliorările și vindecările diferitelor boli, inclusiv a cancerului, atunci când această apă
9 este administrată pacienților fie ca atare, fie sub forma unor preparate farmaceutice sau cos-
metice (US 5788953, WO 96/03996, WO 95/18545).

11 Din stadiul tehnicii rezultă că este cunoscută o metodă experimentală *in vivo*, de sta-
bilire a dozelor necesare de apă sărăcită în deuteriu, pentru tratamentul cancerului (US
13 5788953), dar această metodă prezintă numeroase dezavantaje. Astfel, în metoda descrisă,
sunt utilizate tumori umane (tumoră de prostată, tumoră a sânului etc.), grefate la animalele
15 imunosupresate. Această xenotransplantare (tumoră umană, grefată la animale) a fost obți-
nută pe linii de șoareci singeneici (inbred), și anume linia pură CBA/Ca, animalele fiind în
17 prealabil imunosupresate (WO 95/18545, pag. 3).

19 Este cunoscut însă că, la transplantarea tumorilor maligne umane la animale, există,
foarte frecvent, riscul de respingere (Billingham, R.E. și colab., 1953, *Nature*, 172, 603;
Miles, C.P., 1965, *J.Natl. Cancer Inst.* 34, 103; Comișel, V. și colab, 2001, *Rev. Rom. de*
21 *Oncologie Comparată*, 4, 295).

23 Este deja bine cunoscut faptul că această xenotransplantare de celule, țesuturi și
organe este extrem de greu de obținut, aproape imposibil, xenotransplantul fiind rejectat, în
25 timp, de către organismul gazdă. De asemenea, sunt rejectate și grefele tumorale maligne
în sistem xenogenic. În ceea ce privește xenotransplantarea tumorilor, în general, și a tumo-
27 rilor maligne, în special, la animalele de experiență, există numeroase lucrări științifice publi-
cate, în care se prezintă și se discută condițiile care facilitează reușita xenotransplantării
tumorale, cum sunt:

29 a) folosirea unor tehnici deosebite, de inoculare a celulelor tumorale (inocularea intra-
embrionară, intracraniană, la puii nou născuți, intratesticulară, în camera anterioară a
31 ochiului, sub capsula renală, în puna jugală a hamsterului etc). Xenotransplantarea tumo-
rilor în așa-zisele sedii privilegiate a demonstrat, însă, că procentul de grefe pozitive este
33 neconcludent și variabil, neputând oferi un model experimental, constant și reproductibil
(Comișel, V. și colab, 2001, *Rev. Rom. de Oncologie Comparată*, 4, 295);

35 b) folosirea animalelor cu imunodeficiențe congenitale sau dobândite, șoarecii „nude”
homozigoți, atimici congenital, caracterizați printr-o deficiență a răspunsului imun, mediat
37 celular, timentomia chirurgicală a animalelor nou-născute;

c) inhibarea reactivității imune, pentru inducerea toleranței specifice față de xeno-
39 transplant, prin diverse metode, cum sunt: iradierea cu doze subletale, sub protecție cu anti-
biotice; blocarea sistemului imun, prin inoculare intravenoasă, cu doze masive de suspensii
41 coloidale; administrarea de steroizi corticosuprarenali, seruri antilinfocitare, medicamente
imunosupresoare (ciclofosfamidă, cytotstar etc.) sau ciclosporină.

43 Mijloacele cunoscute, de producere a imunosupresiei la animalele care urmează să
fie supuse xenotransplantărilor tumorale maligne, s-au dovedit a avea efecte nocive asupra
45 stării de sănătate a animalelor imunosupresate, stare care influențează rezultatele testelor
experimentale (Comișel, V. și colab, 2001, *Rev. Rom. de Oncologie Comparată*, 4, 295).

De asemenea, aplicarea unui tratament de supresie imunologică înainte de efectuarea transplantului face ca, ulterior transplantului din timpul experimentului de stabilire a dozei eficiente de apă sărăcită în deuteriu, efectul dozei să nu fie cel real, animalul supresat imunologic având reacții total diferite în comparație cu un animal normal; nu reacționează sau reacționează extrem de slab imunologic.

Un alt aspect important, legat de xenotransplantare, este acela că animalele imunosupresate își redobândesc capacitatea de respingere a grefei de țesut normal sau tumoral malign după o perioadă de 4-6 săptămâni, indiferent de modul de inducere a imunosupresiei.

În experimentele prezentate în brevetul **US 5855921**, se precizează că tumorile maligne umane, xenotransplantate la șoareci și dezvoltate la aceștia, după o perioadă de tratament cu apă sărăcită în deuteriu, au regresat și, apoi, au fost rejectate, datorită acestui tratament.

În acest caz, rejectarea poate fi pusă pe seama unei reacții imunologice normale, gazdă contra grefă tumorală, așa cum a fost arătat mai sus.

De asemenea, precizarea că tumorile maligne, xenotransplantate la animale și tratate apoi cu apă sărăcită în deuteriu, nu metastazează, nu poate fi luată în considerare ca efect al administrării apei, deoarece, așa cum s-a arătat mai sus, tumorile maligne umane, transplantate experimental, nu metastazează sau metastazează foarte rar.

În brevetul **US 5855921**, dozele de deuteriu în apa administrată în experiment nu sunt constante, astfel încât să se poată urmări stabilirea unei doze singulare, eficiente. Astfel, în cursul experimentului, se administrează, pentru început, apă cu un conținut de 30 ppm deuteriu, timp de 3 săptămâni, iar apoi, la același lot de animale, se administrează apă cu un conținut de deuteriu de 110-120 ppm, până la sfârșitul experimentului. În acest fel, este construită plaja concentrațiilor de deuteriu revendicată în brevetul **US 5855921**.

Având în vedere cele de mai sus, se poate constata că experimentele din stadiul tehnicii prezentate de invențiile ale căror autor este Gabor Somlayi sunt neconvigătoare, deoarece, pentru xenotransplantarea folosită, rezultatele obținute sunt influențate de condițiile în care experimentele au fost efectuate, respectiv modalitatea de administrare a dozelor pe o plajă prea mare și folosirea tumorilor umane, în cazuri în care a fost folosită, în prealabil, imunosupresarea animalelor de experiență. De asemenea, din experimentele prezentate în brevetul **US 5855921**, nu rezultă durata totală pentru tratamentul cancerului, respectiv nu este indicată durata și concentrația pentru care efectele sunt maxime.

Problema pe care o rezolvă invenția este aceea că aceasta permite realizarea unei metode de stabilire experimentală, *in vivo*, a concentrației eficiente de deuteriu în apă, astfel încât să se obțină rezultate optime în tratamentul cancerului la șobolani.

Metoda pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru tratamentul cancerului, constă în aceea că aceasta prevede administrarea apei sărăcită în deuteriu înainte și după grefarea tumorală, cu grefe tumorale animale, și are următoarele etape:

A) administrarea șobolanilor Wistar outbred, prin dietă, a apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile de 25, 60 și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor, cărora le-a fost administrată, prin dietă, apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu, pe aceeași durată de timp, de la rețea;

B) stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan;

C) grefarea animalelor din lotul de experiență și a animalelor martor, în a 60-a zi, subcutan, cu 1×10^7 celule tumorale maligne, în 0,5 ml ser fiziologic, de sarcom Walker 256-varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin-variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%;

D) observarea efectelor administrării continue și de lungă durată, prin dietă, a apei sărăcită în deuteriu, la concentrații de 25, 60 și 100 ppm deuteriu, perioadă în care se efectuează următoarele:

a. începând cu ziua a 4-a postgrefare, se execută, la 2...3 zile, controlul și măsurarea nodulilor tumorali;

b. urmărirea stării fiziologice a animalelor, prin cântărire săptămânală, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției toxicității;

c. după 60 de zile, când toate animalele martor au decedat, între ziua 160...200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare, din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun tumoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor, și anume: analiza formulei leucocitare, pentru stabilirea nivelului limfocitelor și a celulelor blastice; analize la nivelul măduvei hematopoietice, pentru stabilirea nivelului plasmocitelor și a nivelului celulelor NK-K;

E) stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru animalele de experiență, rămase în viață, în funcție de instalarea noii homeostazii și rezultatele obținute privind regresia tumorală, cât și vindecările de cancer.

Metoda pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru tratamentul cancerului, prezintă următoarele avantaje:

- este o metodă ce practică grefarea tumorală alogeneică, ce permite o eventuală extrapolare a rezultatelor la om, față de rezultatele obținute de alți autori, pe animale singeneice;

- permite stabilirea exactă a concentrației eficiente de deuteriu;

- rezultatele aplicării metodei sunt exacte și reproductibile, tumorile grefate în sistem alogeneic având un procent de prindere tumorală de 100%, fără regresii tumorale spontane;

- nu este efectuată supresia imunologică a animalelor, ceea ce permite eliminarea unor rezultate fals pozitive;

- nu introduce nici un factor arbitrar în stabilirea concentrației de deuteriu;

- folosește tumori experimentale, bine cunoscute, de screening, folosite curent la aprecierea efectelor citostaticelor.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a metodei conform invenției.

Metoda conform invenției constă în administrarea, la animale de experiență (șobolani), a apei sărăcită în deuteriu, înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale.

Metoda cuprinde următoarele etape:

A) *Administrarea apei sărăcită în deuteriu, înainte de grefarea tumorală*

S-au ales circa 800 animale de experiență, respectiv șobolani Wistar outbred, masculi și femele, cu greutate de 120 ± 20 g, cu stare fiziologică bună, constatată în urma unui examen clinic.

Animalele de experiență au fost repartizate câte 7-8 într-o cușcă (masculii separați de femele).

S-a administrat, la trei loturi de șobolani Wistar outbred, prin dietă, apă sărăcită în deuteriu, cu concentrațiile de 25, 60 și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animale martor, cărora le-a fost administrată, prin dietă, apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu, pe aceeași durată (apă de la rețea).

B) *Stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate*

Înainte de efectuarea grefelor, s-a executat stabilirea viabilității celulelor tumorale, ce urmau a fi grefate, cu albastru de tripan. Pentru această determinare, pe o lamă de microscop, s-au recoltat celule tumorale, obținute conform unor tehnici cunoscute, din tumora

RO 120505 B1

alogeneică, în 0,5 ml ser fiziologic, și s-au adăugat 1-2 picături de albastru de tripan. Celulele colorate în albastru sunt celule moarte. Calculul procentului de viabilitate s-a efectuat prin numărarea celulelor moarte la 1000 celule etalate pe lamă și s-a raportat procentual. Viabilitatea celulelor trebuie să fie de peste 98%.	1 3
C) <i>Grefarea animalelor din lotul de experiență și animalelor martor, cu sarcomul Walker 256-varianta solidă și cu epiteliomul limfotrop T8 Guérin- varianta solidă.</i>	5
În a 60-a zi de la tratamentul preliminar al animalelor, cu apă săracită în deuteriu, conform etapei A), s-a procedat la grefarea șobolanilor din lotul de experiență, cât și din lotul martor, prin tehnici bine cunoscute, subcutan, dorsal, cu 1×10^7 celule tumorale maligne, în 0,5 ml ser fiziologic de sarcom Walker 256- varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin-variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%.	7 9 11
Grefarea s-a executat pe câte trei loturi de 220 animale, ce urmau a li se administra apă săracită în deuteriu, în trei concentrații, respectiv la 25, 60 și la 100 ppm. Din fiecare lot de 220 animale de experiență, două loturi de 79 animale au fost grefate cu sarcomul Walker 256-varianta solidă și un lot de 79 animale a fost grefat cu epiteliomul T8 Guerin- varianta solidă. Celelalte animale s-au folosit ca martori.	13 15
D) <i>Observarea efectelor administrării continue și de lungă durată, prin dietă, a apei săracită în deuteriu, la concentrații de 25, 60 și 100 ppm deuteriu, comparativ cu administrarea, la animale martor, a apei de la rețea, cu conținut de deuteriu de 150 ppm</i>	17 19
Animalelor de experiență, împărțite în trei loturi, li s-a administrat, prin dietă zilnică, apă săracită în deuteriu, în trei concentrații: 30, 60 și 100 ppm, timp de 700 zile. Începutul administrării la animalele de experiență s-a făcut concomitent cu administrarea, la animale martor, tot în dietă zilnică, a apei de la rețea, cu un conținut de deuteriu de 150 ppm.	21 23
În perioada experimentului, s-au efectuat următoarele :	
a. Începând cu ziua a 4-a postgrefare, s-a executat la 2-3 zile, la locul inoculului, controlul și măsurarea nodurilor tumorale, dezvoltate la animalele de experiență. Incidența tumorală a fost, la toate loturile, de 100%. Creșterea tumorilor a fost apreciată prin măsurarea a două diametre, mare și mic, la diferite stadii ale creșterii tumorale. Volumul tumoral a fost calculat după formula $V = a \times b^2 \times 0,4$, în care V este măsurat în mm^3 , a și b fiind cele două diametre, iar 0,4 fiind o constantă.	25 27 29
b. Zilnic, s-a efectuat urmărirea stării fiziologice a animalelor, prin cântărire; s-a urmărit consumul hranei și al apei, cu observarea apariției fenomenelor toxice (hemoragii, diaree, căderea părului etc). De asemenea, zilnic s-a înregistrat mortalitatea. Animalele au fost cântărite la data efectuării măsurătorilor tumorale, deoarece scăderea bruscă în greutate poate fi o manifestare a fenomenelor toxice.	31 33 35
c. După 60 de zile, când toate animalele martor au decedat, de preferință între ziua 160-200 de la grefare, s-a urmărit efectul produs de administrarea apei săracită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare, din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun, tumoral și celular, al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor, și anume: analiza formulei leucocitare, pentru stabilirea nivelului limfocitelor și a celulelor blastice, inclusiv nivelul prezenței celulelor NK-K și al celulelor dendritice; analize la nivelul măduvei hematopoietice, a teritoriilor limfonodate, satelite zonei de grefare tumorală, inclusiv formațiunea tumorală grefată.	37 39 41 43

F) Stabilirea concentrației eficiente, de apă sărăcită în deuteriu, pentru animalele de experiență, rămase în viață, în funcție de instalarea unei noi homeostazii și de rezultatele obținute, privind regresia tumorală și vindecarea de cancer

Aprecieri activității antitumorale a apei sărăcită în deuteriu s-a făcut conform criteriilor NCI (1990). S-a calculat inhibiția creșterii tumorale (ICT%), o valoare de 50% a acestui indice reprezentând o inhibiție puternică a creșterii tumorale. Pentru supraviețuirea animalelor, s-a calculat:

- timpul mediu de supraviețuire (TMS);
- raportul T/C (tratat/control x 100), care trebuie să fie mai mare de 125;
- creșterea timpului de supraviețuire (ILS%), care trebuie să aibă valoarea peste 25-36, în funcție de sistemul experimental folosit;
- calcularea numărului de animale supraviețuitoare pe termen lung, față de numărul animalelor tratate.

Au fost respectate procedurile standard, pentru validarea GLP a modelelor experimentale utilizate în studiile farmacologice. Au fost respectate cele două variabile cerute de GLP: variabila independentă (de predicție), care constă în utilizarea aceluiași număr de celule tumorale, inoculate în aceleași condiții standard, la toate animalele (1×10^7 celule tumorale) și variabila dependentă (variabila de criteriu):

- perioada de latență (în zile de la transplantul tumoral, până la apariția unui nodul tumoral palpabil);
- incidența tumorală-număr de animale cu tumori, fără tumori, rejecții tumorale;
- timpul mediu de supraviețuire (TMS în zile), de la grefarea tumorii până la moartea ultimului animal.

Rezultate

Ca prim rezultat, s-a evidențiat faptul că există diferențe semnificative în ceea ce privește tumorigeneza și evoluția tumorală între martorii cărora li s-a administrat, în dietă, apă curentă de la rețea, pre- și postgrefare tumorală, și șobolanii cărora le-a fost administrată apă sărăcită în deuteriu, în special la concentrația de 60 ppm.

În ceea ce privește perioada de latență, s-a constatat o lungire a acesteia cu 5 zile, la loturile care au primit, în dietă, apă sărăcită în deuteriu, cu concentrația de 60 ppm, față de martori, atât pentru tumora Walker 256, cât și pentru tumora T8 Guérin. Această lungire a perioadei de latență a influențat procentajul șobolanilor cu tumori la diferite stadii ale evoluției tumorale.

Cu privire la supraviețuirea animalelor, s-au constatat următoarele:

- la 60 de zile post inocul tumoral, s-a constatat o ușoară prelungire a TMS, la animalele grefate cu tumora T8 Guérin, la care s-a administrat apă sărăcită în deuteriu, la concentrație 60 ppm, și o prelungire semnificativă a TMS, la animalele grefate cu tumora Walker 256; la animalele grefate cu tumora Walker 256, și criteriile de apreciere ale activității tumorale au valori semnificative ($T/C\% = 150$ și $ILS\% = 50$);

- la animalele grefate cu tumora Walker 256, la care s-a administrat apă sărăcită în deuteriu, în concentrație de 60 ppm deuteriu, în a 60-a zi, mai trăiau 33/79 (41%) din șobolani, față de 20%, la animalele tratate cu apă sărăcită în deuteriu, la concentrație de 25 ppm deuteriu, și 28,5%, la animalele tratate cu apă sărăcită în deuteriu, la concentrație de 100 ppm deuteriu;

- până în a 60-a zi de la inoculul tumoral, toate animalele martor au murit de cancer;
- la 80 de zile, din 79 șobolani grefați cu tumora Walker 256 și tratați cu apă sărăcită în deuteriu, cu concentrația de 60 ppm deuteriu, mai trăiau 27 șobolani, din care 22 fără tumori, procentul șobolanilor care n-au dezvoltat cancer fiind de 34%;

RO 120505 B1

- pentru tumora T8 Guérin și concentrația de 60 ppm deuteriu, la 184 de zile, au fost 8/77 șobolani (10,4%) care nu au dezvoltat cancer, iar 11/77 (14,2%) au prezentat o evoluție tumorală foarte lentă;	1
- la 584 de zile, pentru tumora Walker și concentrația 60 ppm deuteriu, 20/70 șobolani au rămas în viață, ceea ce reprezintă 28,5%, iar la 8/60 (11,1%) din șobolani, la care evoluția tumorală a fost foarte mult prelungită.	3
Rezultatele obținute prin aplicarea metodei conform invenției sunt datorate, în primul rând, modulării celulelor din sistemul imunitar, mediat tumoral și celular, care determină o inhibiție asupra dezvoltării și evoluției celor două tumori maligne experimentale (Walker 256 și T8 Guérin). Dovada acestei acțiuni este ilustrată de următoarele:	5
- la 162 de zile, pentru tumora Walker 256, și la 192 de zile, pentru tumora T8 Guérin, formula leucocitară, la animalele supraviețuitoare cu evoluție tumorală extrem de lentă, prezintă o creștere procentuală a limfocitelor, de 70-80 %, față de 15...20%, la martori; din procentul limfocitelor, 10-15% au fost celule blastice, față de 0%, la martori;	7
- s-a înregistrat un procent crescut al celulelor dendritice (5-8%, față de 0-1%, la martori) și a celulelor NK-K (9-15%, față de 0-1%, la martori);	9
- s-a constatat că măduva hematopoietică a animalelor tratate cu apă sărăcită în deuteriu, la concentrația de 60 ppm deuteriu, prezintă o masivă infiltrare cu imunoblaști, plasmocite și mastocite, ceea ce dovedește o celularitate specifică pentru reacțiile imune, mediate tumoral ;	11
- teritoriul limfopoietic a prezentat imagini identice cu cele din măduva hematopoietică;	13
- celularitatea tumorilor cu evoluție extrem de lentă a fost foarte diferită de cea existentă la martori; astfel, în timp ce la martori, celulele tumorale au fost în proporție de aproape 100% din total celularitate, la animalele care au primit în dietă apă sărăcită în deuteriu, în special cea cu concentrația de 60 ppm deuteriu, pragul acestor celule tumorale nu a depășit 10%, restul celulelor tumorale fiind în necrobioză;	15
- s-a remarcat invazia tumorii de către limfocite și celule NK-K;	17
- analiza citomorfologică a hematopoezei a arătat o formulă leucocitară cu un procent ridicat de limfocite (60-75%), celule limfoide blastice (5-7%), prezența celulelor dendritice (5-8%) și a celulelor NK-K (9-15%) la șobolani care au consumat 1-2 ani, în exclusivitate și în mod continuu, apă sărăcită în deuteriu, 60 ppm deuteriu.	19
Rezultă că șobolani supraviețuitori de cancer au prezentat o remanență pe termen foarte lung a acestei extraordinare stimulări imune, prin administrarea continuă de apă sărăcită în deuteriu, în concentrație de 60 ppm deuteriu, înainte și după grefarea tumorală.	21
În baza rezultatelor obținute prin aplicarea metodei conform invenției, se poate afirma că administrarea continuă de apă sărăcită în deuteriu, la concentrație de 60 ppm deuteriu, timp de 60 de zile, înainte de grefarea tumorală, și administrarea acestei ape timp extrem de îndelungat inhibă dezvoltarea și evoluția celor două tumori maligne experimentale, pe șobolani Wistar outbred, producând, în final, nedezvoltarea cancerului în procente semnificative, cât și prelungirea semnificativă a timpului de supraviețuire a animalelor cu tumori, determinând o evoluție foarte lentă.	23
De asemenea, se poate afirma că apa sărăcită în deuteriu, la concentrația de 60 ppm deuteriu, administrată continuu și timp îndelungat, acționează ca un factor homeostazic, de inhibare a dezvoltării și evoluției tumorilor maligne.	25
Deoarece șobolani supraviețuitori de cancer au prezentat o remanență pe termen foarte lung a sistemului imunitar, în urma administrării continue de apă sărăcită în deuteriu, în concentrație de 60 ppm deuteriu, se poate afirma că apa sărăcită în deuteriu, la concentrația de 60 ppm deuteriu, creează o nouă homeostazie la animalele de experiență la care a fost administrată, producând o modulare a celulelor din sistemul imunitar mediat, tumoral și celular.	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47
	49
	51

Pentru a menține homeostazia indusă de apa sărăcită în deuteriu, este necesar ca administrarea acesteia, odată începută, să fie continuată indefinit (continuu), fără întreruperi accidentale; în caz contrar, homeostazia instalată se perturbă cu ușurință și se poate reveni la faza homeostazică dinaintea administrării apei sărăcite în deuteriu, când condițiile homeostazice pot facilita, din nou, proliferarea clonului malign.

Revendicări

1. Metodă pentru stabilirea *in vivo*, la animale de experiență, a concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru tratamentul cancerului, **caracterizată prin aceea că** aceasta prevede administrarea apei sărăcită în deuteriu, înainte și după grefarea tumorală cu grefe animale, și are următoarele etape:

A) administrarea șobolanilor Wistar outbred, prin dietă, a apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile de 25, 60 și 100 ppm, timp de 60 de zile, concomitent cu animalele martor, cărora le-a fost administrată, prin dietă, apă cu un conținut de 150 ppm deuteriu, pe aceeași durată, din apă de la rețea;

B) stabilirea viabilității celulelor tumorale ce urmează a fi grefate, cu albastru de tripan;

C) grefarea animalelor din lotul de experiență și a animalelor martor, în a 60-a zi, subcutan dorsal, cu 1×10^7 celule tumorale maligne, în 0,5 ml ser fiziologic, de sarcom Walker 256- varianta solidă și epiteliom limfotrop T8 Guérin -variantă solidă, ambele având celule cu viabilitate de peste 98%;

D) observarea efectelor administrării continue și de lungă durată, prin dietă, a apei sărăcită în deuteriu, la concentrații de 25, 60 și 100 ppm deuteriu, perioadă în care se efectuează următoarele :

a. începând cu ziua a 4-a postgrefare, se execută, la 2...3 zile, controlul și măsurarea nodulilor tumorali;

b. urmărirea stării fiziologice a animalelor, prin cântărire săptămânală, urmărirea consumului hranei și al apei, observarea apariției toxicității;

c. după 60 de zile, când toate animalele martor au decedat, între ziua 160...200 de la grefare, se urmărește efectul produs de administrarea apei sărăcită în deuteriu, la concentrațiile stabilite, asupra homeostaziei animalelor supraviețuitoare, din loturile de experiență, respectiv modul de influențare a sistemului imun tumoral și celular al acestor animale, efectuându-se o serie de controale a stării imunologice a animalelor, și anume: analiza formulei leucocitare, pentru stabilirea nivelului limfocitelor și al celulelor blastice; analize la nivelul măduvei hematopoietice, pentru stabilirea nivelului plasmocitelor și nivelului celulelor NK-K;

E) stabilirea concentrației eficiente de apă sărăcită în deuteriu, pentru animalele de experiență rămase în viață, în funcție de instalarea noii homeostazii și de rezultatele obținute privind regresia tumorală, cât și vindecările de cancer.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** aceasta stabilește concentrația de 60 ppm deuteriu în apa sărăcită în deuteriu, concentrație care este cea mai eficientă pentru tratamentul și profilaxia cancerului, prin administrare continuă și de lungă durată a acestei apei în dieta zilnică.

